



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</p> <p><b>C07K 5/062, 5/083, 5/103, 7/06, 16/18, A61K 38/05, 38/06, 38/07, 38/08, G01N 33/68</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 95/09868</b></p> <p>(43) Date de publication internationale: 13 avril 1995 (13.04.95)</p>									
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01158</p> <p>(22) Date de dépôt international: 4 octobre 1994 (04.10.94)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:</p> <table border="0"> <tr> <td>93/11804</td> <td>4 octobre 1993 (04.10.93)</td> <td>FR</td> </tr> <tr> <td>94/07078</td> <td>9 juin 1994 (09.06.94)</td> <td>FR</td> </tr> <tr> <td>94/07079</td> <td>9 juin 1994 (09.06.94)</td> <td>FR</td> </tr> </table> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FILLION, Gilles [FR/FR]; 21, boulevard de la Libération, F-92370 Chaville (FR). ROUSSELLE, Jean-Claude [FR/FR]; 1, villa Baroche, F-93700 Drancy (FR). MASSOT, Olivier [FR/FR]; 15, rue Eugène-Brun, F-94500 Champigny-sur-Marne (FR).</p> <p>(74) Mandataire: LE GUEN, Gérard; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 08 (FR).</p>		93/11804	4 octobre 1993 (04.10.93)	FR	94/07078	9 juin 1994 (09.06.94)	FR	94/07079	9 juin 1994 (09.06.94)	FR	<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée</p> <p><i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
93/11804	4 octobre 1993 (04.10.93)	FR									
94/07078	9 juin 1994 (09.06.94)	FR									
94/07079	9 juin 1994 (09.06.94)	FR									
<p>(54) Title: COMPOUNDS MODIFYING SEROTONINERGIC TRANSMISSION, DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPLICATIONS</p> <p>(54) Titre: COMPOSES MODIFIANT LA TRANSMISSION SEROTONINERGIQUE; APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Compounds having the following peptide sequence: X Leu Y, wherein X is H or Ala or Leu-Ser-Ala, Y is OH or peptide sequence having from 1 to 10 amino acids, with the terminal carboxy end being amidified by a NH<sub>2</sub> group, or esterified by a substituted or non-substituted hydrocarbyloxy, with the proviso that X and Y are not simultaneously H and OH, respectively. The invention also concerns the corresponding compounds wherein the peptide binding group -CO-NH- is replaced by a binding group resisting protease enzymatic degradation, or wherein the peptide backbone comprises one or more intercalated groups making the peptide binding resistant to enzymatic degradation. Also described are compounds comprising a grouping whose spatial structure is substantially identical to that of a peptide of the sequence X-Leu-Y wherein X and Y have the above-mentioned definition.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet des composés de séquence peptidique suivante: X Leu Y, dans laquelle X représente H ou Ala ou Leu-Ser-Ala, Y représente OH ou une séquence peptidique ayant de 1 à 10 aminoacides, dont l'extrémité carboxy terminale est amidifiée par un groupe NH<sub>2</sub> ou estérifiée par un reste hydrocarbyloxy substitué ou non substitué, sous réserve que X et Y ne représentent pas simultanément H et OH, respectivement, ainsi que les composés correspondant dans lesquels le groupe de liaison peptidique -CO-NH- est remplacé par un groupe de liaison résistant à la dégradation enzymatique des protéases, ou dans lesquels le squelette peptidique comporte un ou plusieurs groupes intercalés rendant la liaison peptidique résistante à la dégradation enzymatique, ainsi que les composés comprenant un groupement dont la structure spatiale est sensiblement identique à celle d'un peptide de séquence X-Leu-Y dans laquelle X et Y sont tels que définis ci-dessus.</p>											

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

"Composés modifiant la transmission sérotoninergique;  
applications diagnostiques et thérapeutiques"

La présente invention a pour objet des composés possédant la propriété de modifier la transmission sérotoninergique ainsi que les applications diagnostiques et thérapeutiques de ces composés.

5 Le système sérotoninergique cérébral est un système de neurotransmission cérébral et périphérique, qui met en oeuvre la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) découverte dans les années 1949-50.

10 Au niveau central, ce système est particulier, dans la mesure où il est extrêmement centralisé (tous les corps cellulaires sont localisés dans la région postérieure du cerveau, le raphé) et où il se projette dans pratiquement toutes les régions du cerveau. Il est caractérisé par un nombre extrêmement élevé de varicosités  
15 (ou équivalent de terminaisons neuronales) le long des axones ; cette disposition multiplie ses points d'interactions avec les autres systèmes neuronaux cérébraux. De plus, une très grande partie de ces varicosités ne présente pas de profil synaptique, c'est-à-dire que la 5-HT libérée par ces "terminaisons" va  
20 diffuser et atteindre les cibles (récepteurs) situées à une certaine distance ; ce mécanisme nécessite la mise en oeuvre de récepteurs particuliers possédant une affinité élevée pour l'amine. Cette disposition structurale est tout à fait favorable à une fonction de contrôle  
25 de l'ensemble des cellules neuronales du cerveau, et par là à un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux central.

30 Pour exercer ce contrôle, le système 5-HT met en oeuvre une grande variété de récepteurs spécifiques. Il s'agit en effet de plusieurs familles dont certaines sont bien caractérisées (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>) et d'autres mises en évidence plus récemment sont encore peu

connues (5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>). Certaines d'entre elles sont représentées par de nombreux sous-types ; c'est le cas en particulier de la famille 5-HT<sub>1</sub>, caractérisée par une affinité nanomolaire de la 5-HT pour ces sites, et  
5 qui comporte les sous-types 5-HT<sub>1A,B,D,E,F</sub>.

Les récepteurs de type 5-HT<sub>1B</sub> et 5-HT<sub>1D</sub> sont localisés sur les terminaisons sérotoninergiques et non-sérotoninergiques, où ils modulent la libération du neurotransmetteur contenu dans ces terminaisons, en  
10 particulier ils peuvent réguler la libération de la 5-HT elle-même (autorécepteurs) et jouer alors un rôle déterminant dans l'activité de la neurotransmission sérotoninergique.

D'un point de vue fondamental, le système  
15 sérotoninergique est impliqué dans de très nombreuses fonctions physiologiques et dans de nombreuses pathologies, et notamment dans le syndrome dépressif.

La dépression est un désordre psychiatrique encore mal connu malgré les très nombreuses études qui  
20 lui ont été consacrées. Cependant, il est maintenant assez clair qu'une très grande partie sinon la totalité des dépressions implique le système sérotoninergique et notamment, il est généralement accepté qu'il existe une relation entre un déficit sérotoninergique et le suicide.

25 En outre, les médicaments antidépresseurs interagissent pour un grand nombre d'entre eux avec le système sérotoninergique et les plus récents, qui sont les plus efficaces et qui possèdent le moins d'effets indésirables, sont le plus souvent de type "sérotoninergique". Ces substances aboutissent toutes, par des  
30 mécanismes divers, à faciliter la transmission sérotoninergique (inhibiteurs de monoamine oxydases, inhibiteurs de recapture, agonistes 5-HT<sub>1A</sub>). Mais d'une part, leur efficacité est limitée, et d'autre part, ils possèdent  
35 encore pour nombre d'entre eux des effets secondaires

importants, et enfin, leur délai d'action est important (> 2 semaines).

Les résultats récents de la littérature et des inventeurs indiquent que les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> pourraient jouer un rôle important dans le syndrome dépressif et dans le mécanisme d'action des antidépresseurs. Il a en effet été montré que non seulement ils modulent la libération d'acétylcholine, mais ils modulent aussi celle de la 5-HT elle-même, et par là même régulent de façon efficace la transmission sérotoninergique dont on sait l'importance dans le syndrome dépressif. De plus, ils sont la cible des antidépresseurs qui interagissent de façon vraisemblablement non compétitive ; autrement dit, les antidépresseurs reconnaîtraient un site distinct des récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>, mais étroitement interactif avec ces derniers.

Les travaux des inventeurs ont permis la mise en évidence d'un composé endogène cérébral reconnaissant un site récepteur capable d'interagir avec le fonctionnement de certains récepteurs 5-HT, en particulier les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> qui modulent la libération de la 5-HT elle-même.

Le composé endogène cérébral mis en évidence est un tétrapeptide de séquence :

25

Leu - Ser - Ala - Leu (séquence LSAL).

Les inventeurs ont également testé l'activité de peptides comprenant une partie de la séquence LSAL ou la séquence LSAL modifiée et montré que ces composés avaient encore une bonne activité sur les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>. De manière générale, une modification (par exemple une acétylation) de l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale aboutit à un composé ayant une moins bonne activité de ligand sur le récepteur 5-HT, alors que des modifications

de l'extrémité COOH permettent d'obtenir un peptide qui présente encore une activité importante.

Par exemple, l'adjonction de la séquence Gly-Gly-Gly-Tyr à l'extrémité COOH de la séquence LSAL permet d'obtenir un composé ayant une activité encore importante. Cependant, l'adjonction de la même séquence, mais dont le résidu Tyr est iodé aboutit à un composé n'ayant plus d'activité de ligand du récepteur 5-HT, probablement en raison de l'encombrement stérique dû à la taille importante des atomes d'iode qui empêche la liaison du peptide ainsi modifié sur son récepteur.

L'invention a ainsi pour objet un composé de séquence peptidique

15

X Leu Y

dans laquelle X représente H ou Ala ou Leu-Ser-Ala, Y représente OH, ou une séquence peptidique ayant de 1 à 10 aminoacides, dont l'extrémité carboxy terminale est amidifiée par un groupe  $\text{NH}_2$  ou estérifiée par un reste hydroxycarboxyloxy substitué ou non substitué, sous réserve que X et Y ne représentent pas simultanément H et OH, respectivement ainsi que les composés correspondants dans lesquels le groupe de liaison peptidique  $-\text{CO}-\text{NH}-$  est remplacé par un groupe de liaison résistant à la dégradation enzymatique des protéases, ou dans lesquels le squelette peptidique comporte un ou plusieurs groupes intercalés rendant la liaison peptidique résistante à la dégradation enzymatique.

30

Ainsi, le groupe de liaison peptidique ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ) est avantageusement remplacé par un groupe de liaison  $-\text{CO}-\text{NR}'-$ ,  $-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_3\text{R}_4-$ ,  $-\text{CO}-\text{CR}_1\text{R}_2-$ ,  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$  et  $\text{R}_4$ , identiques ou différents, représentant H ou un groupe alkyle en  $\text{C}_1-\text{C}_6$ , notamment un groupe méthyle, et  $\text{R}'$

35

représentant un groupe alkyle en  $C_1-C_6$ .

Parmi les groupes pouvant être intercalés dans le squelette peptidique, on peut citer les groupes suivants  $-CR_1R_2-$ ,  $-NR_1-$  et  $-O-$ ,  $R_1$  et  $R_2$  étant définis  
5 comme précédemment.

Par reste hydrocarbyloxy, on entend notamment un groupe alkyloxy, alcényloxy ou alcynyloxy, à chaîne linéaire ou ramifiée, ayant de 1 à 10 atomes de carbone non substitué ou substitué par un ou plusieurs groupes  
10 choisis parmi OH,  $NH_2$ ,  $NO_2$ , Cl, Br, F,  $CF_3$ , par exemple le groupe  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $OCHOH-CH_3$ ,  $OCHOH-CH_2OH$ ,  $OCH_2CH_2NH_2$ ,  $OC_3H_7$ , etc...

L'invention a plus particulièrement pour objet un composé de séquence peptidique suivante :

15

Leu - Ser - Ala - Leu - Z

dans laquelle Z représente OH,  $NH_2$ , un reste hydrocarbyloxy substitué ou non substitué, ou une séquence peptidique ayant de 1 à 10 aminoacides, ainsi que les composés  
20 correspondants dans lesquels la liaison peptidique est remplacée par une liaison résistante à la dégradation enzymatique des protéases ou dans lesquels le squelette peptidique comporte un ou plusieurs groupes intercalés  
25 rendant la liaison peptidique résistante à la dégradation enzymatique.

La nature des aminoacides de Z est indifférente, la limite étant que lorsqu'il s'agit d'acides aminés modifiés (non codés génétiquement), ceux-ci ne soient pas  
30 substitués par un groupe encombrant (ayant une taille supérieure à celle du rayon de l'atome d'iode).

Les composés selon l'invention comprennent notamment les peptides de séquence suivante :

Ala - Leu;

35

Leu -Ser;

Ala - Leu -Ser;

Leu - Ser - Ala - Leu;

Leu - Ser - Ala - Leu - OCH<sub>3</sub>;

Leu - Ser - Ala - Leu - NH<sub>2</sub>;

5           Leu - Ser - Ala - Leu - Gly - Gly - Gly - Tyr;

ainsi que les composés analogues dans lesquels la liaison peptidique est remplacée par une liaison telle que définie ci-dessus, ou dont le squelette comprend un  
10 groupe intercalé tel que défini ci-dessus.

Les composés les plus actifs sont ceux dont les aminoacides constitutifs sont sous la forme L, c'est-à-dire la forme naturelle pour les structures peptidiques définies ci-dessus.

15           Les composés selon l'invention sont préparés par extraction à partir de cerveau lyophilisé comme décrit ci-après ou plus avantageusement par synthèse peptidique classique, par exemple par la méthode en phase solide de MERRIFIELD lorsqu'ils sont de nature exclusive-  
20 ment peptidique, ou encore par modification des groupes terminaux des aminoacides et condensation des résidus ainsi obtenus, les fonctions réactives autres que celles engagées dans la liaison entre les résidus successifs ayant été préalablement protégées à l'aide des groupes  
25 protecteurs bien connus de l'homme du métier.

Selon un exemple de préparation d'un peptide selon l'invention, on fixe sur une résine, par l'intermédiaire de son groupe carboxylique, le premier résidu de l'extrémité COOH terminale dont la fonction amine est  
30 protégée par un groupe terbutyloxycarbonyle, puis, après avoir déprotégé la fonction amine en lavant la résine avec de l'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane, on couple dans le diméthylformamide le second résidu d'acide aminé dont la fonction amino est protégée comme  
35 précédemment, on fixe ainsi les uns après les autres les



résidus aminoacides qui vont constituer la portion du peptide selon l'invention. Après déprotection, la fonction amine du résidu N-terminal peut être acétylée par action d'un excès d'anhydride acétique en présence  
5 de diisopropyléthylamine.

Les chaînes latérales réactives des aminoacides peuvent être protégées par exemple par un groupe benzyle, pour les chaînes latérales hydroxyles.

Après avoir éliminé le groupe protecteur, le  
10 peptide selon l'invention est libéré du support solide, par exemple avec de l'acide fluorhydrique. Le produit brut est lyophilisé et soumis à une chromatographie en phase liquide à moyenne pression, permettant d'obtenir un produit pratiquement pur ; celui-ci est alors caracté-  
15 risé par chromatographie en phase liquide à haute pression ainsi que par l'analyse de sa composition en aminoacides et par spectrométrie de masse.

Les peptides caractérisés possèdent la propriété de modifier la transmission sérotoninergique  
20 par ses interactions avec les autorécepteurs (et aussi les hétérorécepteurs) et jouent un rôle clef dans diverses pathologies psychiatriques où le système 5-HT est notoirement mis en jeu (stress, anxiété, dépression, obsessions compulsives, troubles de l'appétit, du  
25 sommeil, troubles du comportement, agressivité, etc...).

L'invention a également pour objet un composé apte à remplir le rôle de ligand du récepteur sur lequel se fixe le peptide endogène de séquence Leu-Ser-Ala-Leu (LSAL), caractérisé en ce qu'il comprend un groupement  
30 dont la structure spatiale est sensiblement identique à celle d'un peptide de séquence

X - Leu - Y

35 dans laquelle X et Y sont tels que définis précédemment,

X et Y ne représentant pas simultanément H et OH, respectivement.

Un tel composé peut être un agoniste ou un antagoniste du peptide LSAL.

5 Par structure "spatiale sensiblement identique", on entend au sens de la présente invention que la position moyenne des atomes formant le groupement qui se lie au récepteur ne diffère qu'au plus de 5 %, et de préférence au plus de 2 % de la position moyenne des  
10 atomes formant le peptide correspondant.

Parmi les composés préférés, on peut citer ceux comprenant un groupement dont la structure spatiale est sensiblement identique aux di-, tri- et tétrapeptides suivants :

15 Ala-Leu  
Leu-Ser  
Ala-Leu-Ser  
Leu-Ser-Ala-Leu.

Les composés selon l'invention sont élaborés  
20 à partir de(s) la (les) structure(s) spatiale(s) des peptides selon l'invention par modélisation informatique et synthèse chimique classique à partir de la structure obtenue après modélisation, comme décrit dans J. Med. Chem., vol. 37, N° 9, pp. 1233 à 1251 et J. Med. Chem.,  
25 vol. 37, N° 10, pp. 1385-1401.

Avantageusement, ces composés sont élaborés en outre en s'appuyant sur la structure spatiale de molécules d'antidépresseur connues actives sur ce même site.

30 La technique par modélisation permet notamment de définir et caractériser la structure de molécules n'affectant pas les sites de transport des amines (à la différence de la plupart des antidépresseurs connus actuellement) mais affectant le seul site allostérique  
35 porté par les récepteurs 5-HT<sub>1B/D</sub>.

L'invention a également pour objet une composition thérapeutique comprenant un composé tel que défini ci-dessus, capable de traverser la barrière hématoencéphalique.

5 Pour traverser la barrière hématoencéphalique, le peptide est de préférence administré sous la forme d'une pro-drogue, notamment de type glycosylphospho-triester, dans laquelle le peptide est lié par exemple par la leucine au groupe phosphate, comme décrit  
10 dans J. MED. CHEM. 92, Vol. 35, p. 30-39.

Une telle pro-drogue, ainsi que de manière générale une molécule précurseur susceptible de libérer in vivo un composé selon l'invention, consitue un autre objet de l'invention.

15 La composition thérapeutique est utilisée avantageusement dans des pathologies dans lesquelles est impliqué le système sérotoninergique, notamment dans les pathologies liées à une déficience de la transmission sérotoninergique.

20 Ainsi, la composition selon l'invention peut être utilisée en particulier dans le traitement de la dépression, mais également dans toutes les indications actuellement couvertes par les antidépresseurs, comme les troubles obsessionnels compulsifs, l'anxiété généralisée,  
25 la crise de panique, les troubles de l'appétit, du sommeil, l'impulsivité, les troubles sexuels, l'agressivité, et plus généralement celles des composés facilitant la transmission sérotoninergique.

La composition selon l'invention se présente  
30 avantageusement sous forme injectable ou orale, ou sous toute autre forme pharmaceutique connue.

La dose thérapeutique efficace est aisément déterminée par l'homme du métier en fonction de la nature et de la gravité de la pathologie à traiter, ainsi que  
35 du poids et de l'âge du patient. Les composés selon

l'invention ne sont pas toxiques. Ils sont ajoutés à un véhicule pharmaceutiquement acceptable ou à un excipient bien connu de l'homme du métier.

5 L'invention a également pour objet un procédé de diagnostic in vitro d'une affection liée au système sérotoninergique chez un patient, caractérisé en ce que l'on effectue un dosage dans un fluide biologique du patient d'un peptide de séquence

10 Leu - Ser - Ala - Leu

Le dosage est effectué notamment par une méthode immunologique comprenant la mise en présence d'un prélèvement biologique avec un anticorps spécifiquement  
15 dirigé contre un peptide selon l'invention et la mise en évidence du complexe antigène-anticorps ainsi formé.

Ces procédés peuvent être basés sur une méthode radioimmunologique de type RIA, RIPA ou IRMA, ou sur une méthode immunoenzymatique, par exemple de type  
20 ELISA.

Le fluide biologique peut être le sang, l'urine ou le liquide céphalo-rachidien.

Les anticorps peuvent être monoclonaux ou polyclonaux et constituent, ainsi que leurs fragments  
25 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> et Fc, un autre objet de l'invention.

Les anticorps sont obtenus par couplage d'un peptide selon l'invention sur un peptide ou une protéine porteurs immunogènes.

L'invention a également pour objet un kit de  
30 diagnostic pour le dosage d'un peptide selon l'invention dans un fluide corporel d'un patient chez lequel on suspecte une pathologie liée à une déficience de la transmission sérotoninergique, notamment une dépression masquée, comprenant au moins un anticorps tel que défini  
35 ci-dessus et éventuellement les réactifs pour la mise en

oeuvre du dosage.

Les peptides de l'invention se sont révélés inactifs sur le site de recapture de la 5-HT.

5 L'existence d'un facteur endogène cérébral non actif sur le site de recapture constitue un standard de référence en terme d'activité et permet ainsi d'envisager un procédé de sélection de substances antidépres-

sives, consistant à discriminer entre l'effet de recapture et l'effet d'interaction sur le site 5-HT<sub>1B/1D</sub>.

10 Ce procédé s'applique aux antidépresseurs connus et permet également la mise au point de médicaments nouveaux.

En pratique, la discrimination entre l'effet de recapture et l'effet sur le site 5-HT<sub>1B/1D</sub> peut être effectuée en réalisant des essais d'inhibition de liaison

15 entre d'une part des quantités croissantes d'antidépresseurs et la capture de la 5-HT dans les synaptosomes, la 5-HT étant radiomarkée et d'autre part en réalisant des essais de même type sur le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> en faisant

20 varier la quantité d'antidépresseurs en présence d'un ligand radiomarké spécifique de ces récepteurs, et en déterminant les K<sub>i</sub> respectifs ou de façon plus générale les CI<sub>50</sub>.

Le choix d'antidépresseurs ayant une activité sélective sur le site 5-HT<sub>1B/1D</sub> sera dicté par les substances présentant un K<sub>i</sub> élevé ou une CI<sub>50</sub> faible dans l'essai de recapture et inversement un K<sub>i</sub> faible ou une CI<sub>50</sub> élevée dans l'essai d'inhibition de liaison sur le site de reconnaissance du peptide du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub>.

30 On peut également et plus aisément utiliser le peptide radiomarké (tritium) pour identifier et caractériser le site spécifique de reconnaissance du peptide, et ainsi directement étudier les capacités de diverses substances à déplacer (compétition) ce peptide en mesurant leur K<sub>i</sub> et en comparant ce dernier aux valeurs de K<sub>i</sub> obtenues

35

pour ces mêmes substances pour inhiber la capture de la 5-HT (ou déplacer un inhibiteur de recapture ( $^3\text{H}$  paroxetine par exemple)).

- 5                    Un autre objet de l'invention consiste également en un procédé de mise en évidence de ligands du site du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> pour le peptide LSAL, caractérisé en ce que l'on effectue les étapes consistant à :
- 10                    - mettre en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non identifiées avec une cellule recombinée exprimant à sa surface le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> en présence d'un composé selon l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> et ladite (lesdites)
- 15                    molécule(s), dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub>;
- détecter la quantité dudit composé selon l'invention liée au récepteur;
- 20                    - en déduire la fixation éventuelle de ladite (desdites) molécule(s).
- Ce procédé peut être utilisé pour la mise en évidence d'agonistes ou d'antagonistes du peptide LSAL.

- 25                    Un autre objet de l'invention concerne un procédé de mise en évidence de modulateurs (antagonistes ou agonistes) du site du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> pour le peptide LSAL caractérisé en ce que l'on effectue les étapes consistant à :
- 30                    - mettre en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non identifiées, avec une cellule recombinée exprimant à sa surface le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> en présence d'un composé selon l'invention, dans des conditions permettant
- 35                    l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> et ledit composé

selon l'invention;

- détecter les molécules capables de mimer ou d'antagoniser l'activité du composé selon l'invention sur ledit récepteur.

5 Des ligands obtenus selon un procédé tel que décrit ci-dessus peuvent être utilisés comme principe actif d'une composition thérapeutique utile dans le traitement de troubles psychiatriques tels que la dépression, circulatoires tels que la migraine, ou  
10 immunologiques liés aux récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>.

Les composés selon l'invention sont également utiles comme outils de diagnostic pour marquer les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>, et plus particulièrement le site de liaison du peptide endogène sur ces récepteurs.

15 A cette fin, on utilise avantageusement une composition de diagnostic comprenant un composé selon l'invention radiomarké dans une technique d'imagerie mettant en oeuvre un scanner de tomographie par émission de positons.

20 On décrira ci-après l'isolement et la caractérisation du peptide Leu-Ser-Ala-Leu selon l'invention, ainsi que les propriétés de liaison et les activités pharmacologiques sur les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> du peptide Leu-Ser-Ala-Leu en se reportant aux figures  
25 annexées sur lesquelles :

- La Figure 1 représente les interactions de liaison avec le [<sup>125</sup>I]cyanopindolol.

La liaison du [<sup>125</sup>I]cyanopindolol a été mesurée comme décrit dans HOYER D. et al., Eur. J. Pharmacol. 118, 1-12 (1985).  
30

- La Figure 1A représente les résultats obtenus avec des membranes corticales de cerveau de rat (50 µg de protéines), incubées pendant 60 minutes à 37°C dans un volume total de 100 µl en présence de [<sup>125</sup>I]cyanopindolol 0,3 nM.  
35

L'incubation a été effectuée dans un tampon tris-HCl 5 mM, pH 7,5, contenant 154 mM NaCl, 1  $\mu$ M de pargyline, 30  $\mu$ M d'isoprotérénol et différentes concentrations du peptide ( $10^{-13}$  à  $10^{-8}$  M). Chaque point correspond à une moyenne plus ou moins l'écart type de cinq déterminations indépendantes.

- La Figure 1B représente les résultats obtenus avec des membranes de cellules NIH 3T3, transfectées avec le gène du récepteur 5-HT<sub>1B</sub> (50  $\mu$ g de protéines), incubées pendant 60 minutes à 37°C en présence de [<sup>125</sup>I]cyanopindolol 0,3 nM. La liaison a été mesurée comme pour la Figure 1A.

- La Figure 1C représente les résultats obtenus des membranes corticales de cerveau de rat (50  $\mu$ g de protéines) incubées pendant 60 minutes à 37°C dans un volume total de 100  $\mu$ l en présence de concentrations croissantes de [<sup>125</sup>I]cyanopindolol (0,06 à 0,35 nM) avec (O) ou sans (●), le peptide à 1 nM. Chaque point correspond à la moyenne plus ou moins l'écart type de trois déterminations indépendantes.

- La Figure 1D représente la courbe de Scatchard des courbes de saturation.

- La Figure 2 représente les résultats des effets de LSAL sur l'activité adénylylcyclase stimulée par la forskoline.

Des membranes de cellules NIH 3T3 exprimant le gène du récepteur 5-HT<sub>1B</sub> de souris ont été mises en suspension et homogénéisées avec un homogénéisateur Dounce dans un tampon tris-HCl 50 mM pH 7,4 contenant MgCl<sub>2</sub> à 3 mM et EGTA à 0,2 mM (tampon TME).

Les activités adénylyl cyclase ont été mesurées dans des fractions aliquotes de 50  $\mu$ l (30-50  $\mu$ g de protéines) d'homogénéisats dans un volume final de 100  $\mu$ l contenant 0,1 mM, [ $\alpha^{32}$ P]ATP (1 $\mu$ Ci), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M GTP, 10  $\mu$ M forskoline, 100 mM NaCl, 10 mM théophylline,



20 mM phosphocréatinine, 0,2 mg/ml créatine kinase, 1 mM [<sup>3</sup>H]AMPC ( $\approx$  15 000 cpm/essai) et les substances à étudier.

Les membranes ont été incubées pendant 20 minutes à 30°C. La réaction a été arrêtée par addition de 200 µl d'ATP à 5 mM, 5 mM d'AMPC et du dodécyl sulfate de sodium à 1% dissous dans 50 mM de tampon Tris-HCl.

Le [<sup>32</sup>P]AMPC formé a été isolé par la méthode de chromatographie à deux colonnes décrite par Salomon et al. (Adv. Cyclic Nucleotide Res., 10, 35-55 (1979)., modifié par De Vivo et Maayani (J. Pharmacol. Exp. Therap. 238, 248-253 (1986)).

- La Figure 2A exprime l'effet de LSAL en fonction de sa concentration sur l'activité enzymatique stimulée par la forskoline en présence de 0,1 µM de 5-HT.

- La Figure 2B exprime la courbe dose-réponse de l'effet de 5-HT sur l'activité enzymatique stimulée par la forskoline en l'absence (● ---- ●), ou en présence (○ ---- ○) de LSAL ( $10^{-9}$  M).

- La Figure 3 représente l'effet du peptide sur la libération de sérotonine dans des synaptosomes de l'hippocampe de cerveau de rat. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la libération de [<sup>3</sup>H]5-HT (rapport  $P_2/P_1$ ) en l'absence de peptide. Chaque point est la moyenne plus ou moins l'écart type de déterminations en triple obtenue à l'aide de 3-6 homogénéisats d'hippocampe distincts.

La méthode mise en oeuvre est la méthode décrite précédemment (BOLANOS-JIMENEZ B. et al., Eur. J. Pharmacol. 242, 1-6 (1993)) avec les modifications suivantes : la [<sup>3</sup>H]acétylcholine était substituée par 60 nM [<sup>3</sup>H]5-HT et 0,01% d'acide ascorbique était ajouté au milieu d'incubation.

**1. Isolement et purification du peptide Leu-Ser-Ala-Leu**

En utilisant comme critère de discrimination la capacité d'un facteur potentiel à interagir avec la reconnaissance de la 5-HT par le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> de membranes de synaptosomes de cerveau de rat, comme décrit dans FR-2 657 784, un composé actif a été purifié à partir d'extraits de cerveaux de rat, de cheval et de bovin. La méthodologie de purification a fait appel à des séparations par perméation sur gel, des phases normales ou inversées ou encore des échanges ioniques.

Elle est résumée sur le tableau ci-dessous :

Etapes de purification du peptide endogène

5	ETAPES DE LA CHROMATOGRAPHIE	CONDITIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE	FRACTION ACTIVE (Temps d'élution ou de rétention)
	EXCLUSION DE TAILLE (TSK HW 40S, Merck, 600 x 26 mm)	Elution isocratique avec un tampon d'acétate d'ammonium (CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> ) 50mM (pH 5) Vitesse d'écoulement : 2 ml.min <sup>-1</sup>	T <sub>E</sub> = 80 min.
10	PHASE INVERSE (C <sub>18</sub> , Ultrabase, Shandon, 250 x 10 mm)	Gradient d'élution linéaire de A à B pendant 12 minutes : A : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5) ; B : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5)/CH <sub>3</sub> CN, 88/12 Gradient par étapes pendant 5 min. avec C. C : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5)/CH <sub>3</sub> CN, 50/50 Vitesse d'écoulement : 4 ml.min <sup>-1</sup>	T <sub>R</sub> = 20 min.
15	EXCLUSION DE TAILLE (Sephadex G <sub>25</sub> , Pharmacia, 450 x 16 mm)	Elution isocratique avec 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5) Vitesse d'écoulement : 0,3 ml.min <sup>-1</sup>	T <sub>E</sub> = 240 min.
20	PHASE INVERSE (C <sub>18</sub> , Ultrabase, Shandon, 250 x 10 mm)	Gradient d'élution linéaire de A à B pendant 15 minutes A : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5)/CH <sub>3</sub> CN, 85/15 B : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5)/CH <sub>3</sub> CN, 75/25 Gradient par étapes pendant 5 min. avec C. C : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5)/CH <sub>3</sub> CN, 50/50 Vitesse d'écoulement : 4 ml.min <sup>-1</sup>	T <sub>R</sub> = 5,75 min.
25	PHASE INVERSE (C <sub>18</sub> , Ultrabase, Shandon, 250 x 10 mm)	Gradient d'élution linéaire de A à B pendant 35 minutes A : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5) ; B : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5)/CH <sub>3</sub> CN, 70/30 Vitesse d'écoulement : 4 ml.min <sup>-1</sup>	T <sub>R</sub> = 28 min.
	PHASE PSEUDO-INVERSE (Colonne de charbon, Hypercarb., Shandon, 100 x 3 mm)	Gradient d'élution linéaire de A à B pendant 30 minutes A : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5) ; B : 50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (pH 5)/CH <sub>3</sub> CN, 70/30 Vitesse d'écoulement : 1 ml.min <sup>-1</sup>	T <sub>R</sub> = 12,71 min.
30	PHASE INVERSE (C <sub>18</sub> , Ultrabase, Shandon, 150 x 4 mm)	Elution isocratique avec 0,05% TFA/CH <sub>3</sub> CN, 83/17 Vitesse d'écoulement : 1 ml.min <sup>-1</sup>	T <sub>R</sub> = 5,14 min.

La caractérisation des fractions obtenues a  
 été réalisée essentiellement sur la base d'analyse par

RMN, d'analyse d'acides aminés et de séquençage d'acides aminés. Le composé purifié consistait en Leu-Ser-Ala-Leu.

La même fraction a été obtenue également à partir de cerveau de cheval et de bovin, ce qui signifie  
5 que ce peptide est conservé chez les mammifères.

## 2. Interactions du peptide purifié avec les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>

Le peptide synthétique LSAL a été testé pour  
10 sa capacité à "mimer" les effets de la fraction purifiée obtenue à partir d'extraits de cerveau. LSAL inhibe la liaison de [<sup>3</sup>H]-5-HT aux récepteurs 5-HT<sub>1</sub> avec une CI<sub>50</sub> proche de 10<sup>-11</sup>M et un effet inhibiteur maximum de 30 à 50% se produisant à une concentration de 10<sup>-9</sup>M. La  
15 liaison aux 5-HT<sub>1nonA</sub>, qui dans les conditions expérimentales mises en oeuvre, représente principalement des sites 5-HT<sub>1B/1D</sub>, est inhibée jusqu'à une valeur maximale de 75%, comme représenté au tableau 2 ci-dessous avec une CI<sub>50</sub> identique.

20 Cette dernière observation indique que les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> sont particulièrement sensibles au peptide. C'est pourquoi des essais ont été réalisés sur des homogénéisats de tissu cérébral de rat dans lesquels les récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> étaient marqués spécifiquement avec  
25 du [<sup>125</sup>I] cyanopindolol, l'interaction correspondait à une CI<sub>50</sub> de 10<sup>-11</sup>M et un effet maximum de 60%d'inhibition, comme représenté à la Figure 1A.

En outre, l'activité de ce peptide sur les récepteurs 5-HT<sub>1D</sub> a été démontrée chez le cobaye et sur  
30 le cerveau humain à l'aide de [<sup>3</sup>H]5-HT. La valeur de la CI<sub>50</sub> était à nouveau de 10<sup>-11</sup>M. Ces résultats suggèrent fortement que in vitro, les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> constituent la cible du peptide LSAL.

L'activité du peptide a également été évaluée sur la liaison aux récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> dans des cellules NIH 3T3 transfectées avec le gène du récepteur 5-HT<sub>1B</sub> de la souris.

5 L'effet inhibiteur du peptide était très similaire à celui observé dans les homogénéisats de tissu cérébral (Figure 1B).

10 L'effet maximum correspondait à 70% d'inhibition de la liaison spécifique du [<sup>125</sup>I] cyanopindolol avec une valeur de la CI<sub>50</sub> de 10<sup>-11</sup>M. Ce résultat démontre clairement que LSAL interagit directement avec les récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>.

15 Pour étudier plus loin le type d'interaction du tétrapeptide avec les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>, des courbes de saturation du ligand radiomarké ont été établies en présence du peptide. Les résultats de liaison obtenus suggèrent que l'activité inhibitrice du peptide correspond à une interaction non compétitive (Figures 1C, 1D).

20 Ce résultat a été observé avec la [<sup>3</sup>H]5-HT, aussi bien qu'avec le [<sup>125</sup>I]cyanopindolol pour marquer les récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> et est en accord avec l'hypothèse précédente de l'existence d'un site spécifique pour le peptide distinct mais étroitement apparenté au site de liaison de 5-HT.

25 La spécificité pharmacologique des fractions partiellement purifiées a été étudiée au cours d'une purification ultérieure en utilisant des homogénéisats de cerveau de rat. Les essais ont été effectués en utilisant le LSAL synthétique pour déterminer si le peptide interagissait ou non avec d'autres récepteurs 5-HT, ou ceux d'autres neuro-transmetteurs.

30 Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> n'étaient pas affectés à une concentration du peptide qui antagonisait fortement la liaison au 5-HT<sub>1B/1D</sub>.

De manière analogue, la liaison de radio-ligands aux récepteurs 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2</sub> et 5-HT<sub>3</sub> n'était pas affectée (Tableau 2), ce qui indique que parmi les récepteurs sérotoninergiques étudiés, seule la classe 5-HT<sub>1B/1D</sub> était sensible au peptide. La liaison d'autres radio-ligands spécifiques à des récepteurs de neurotransmetteurs variés a été examinée : les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques, dopaminergiques, muscariniques, histaminergiques, aux opiacées et aux benzodiazépines. La liaison à ces récepteurs n'était pas significativement réduite par LSAL à des concentrations qui avaient un effet inhibiteur maximum pour la liaison aux récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> (Tableau 2).

15

**Tableau 2**

20

**Effet inhibiteur du peptide sur différentes liaisons  
de radioligands dans des tissus de cerveau de rat**

25

30

35

	<u>RECEPTEURS</u>	<u>LIGANDS</u>	<u>EFFET INHIBITEUR</u> <u>EN %</u> <u>DU TEMOIN</u>
5	<u>SEROTONINERGIQUES</u>		
	5-HT <sub>1A</sub>	[ <sup>3</sup> H]8-OH-DPAT (3 nM)	0
10	5-HT <sub>1B</sub>	[ <sup>125</sup> I]cyanopindolol (0,3 nM) + 30 $\mu$ M isoproterenol + 0,1 nM 8-OH DPAT	70 $\pm$ 2
	5-HT <sub>1NONA</sub>	[ <sup>3</sup> H]5-HT (30 nM) + 0,1 $\mu$ M 8-OH-DPAT	75 $\pm$ 3
	5-HT <sub>1EFC</sub>	[ <sup>3</sup> H]5-HT (30 nM) + 20 nM 5-CT	0 $\pm$ 10
	5-HT <sub>2A</sub>	[ <sup>3</sup> H]kétansérine (5 nM)	10 $\pm$ 5
15	5-HT <sub>2A</sub>	[ <sup>3</sup> H]DOB (5 nM)	2 $\pm$ 8
	5-HT <sub>3</sub>	[ <sup>3</sup> H]BRL 43694 (3 nM)	0 $\pm$ 10
	<u>ADRENERGIQUES</u>		
20	$\alpha_1$	[ <sup>3</sup> H]prazosine (2 nM)	5 $\pm$ 3
	$\beta$	[ <sup>3</sup> H]dihydroalprénolol (3 nM) + 5-HT 10 <sup>-5</sup> M	10 $\pm$ 15
	<u>DOPAMINERGIQUES</u>		
25	D <sub>2</sub>	[ <sup>3</sup> H]spipérone (2 nM) + 10 $\mu$ M 5-HT	2 $\pm$ 3
	<u>HISTAMINERGIQUES</u>		
	H <sub>1</sub>	[ <sup>3</sup> H]mépyramine (5 nM)	10 $\pm$ 10
	<u>MUSCARINIQUES</u>	[ <sup>3</sup> H]benzylate de quinuclidinyle (3 nM)	0 $\pm$ 2
30	<u>OPIACEES</u>	[ <sup>3</sup> H]naloxone (2 nM)	10 $\pm$ 10
	<u>BENZODIAZEPINES</u>	[ <sup>3</sup> H]flunitrazépam (3 nM)	2 $\pm$ 2

Légendes du Tableau 2 :

Des membranes cérébrales de cerveau de rat (200 µg) ont été incubées pendant 30 minutes à 25°C avec différents radio-ligands spécifiques (voir Tableau) en présence ou en absence de 1 nM du peptide.

Les différentes conditions de liaisons utilisées pour les récepteurs sérotoninergiques sont celles décrites précédemment (PALACIOS J.M. et al., Methods in Neurosciences 12, 238-262 (1993)). Pour les autres liaisons, le milieu d'incubation consistait en 50 mM Tris-HCl pH 7,4 contenant 120 mM de NaCl et 50 mM de KCl ([<sup>3</sup>H]spiropéridol, [<sup>3</sup>H] benzylate de quinuclidinyle, [<sup>3</sup>H]naloxone, ou 4 mM de CaCl<sub>2</sub> et 4 mM de MgCl<sub>2</sub> ([<sup>3</sup>H]flunitrazépam), ou 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> et 1 mM de MgSO<sub>4</sub> ([<sup>3</sup>H]prazosin), ou 90 mM de NaCl ([<sup>3</sup>H]dihydroalprénolol).

Chaque point correspond à une moyenne plus ou moins l'écart type de cinq déterminations indépendantes.

Le tétrapeptide identifié n'a pas montré d'autre effet sur la recapture de 5-HT dans les préparations synaptosomales. Il n'a pas non plus montré d'effet sur la recapture d'autres neurotransmetteurs (ou leurs précurseurs), par exemple la choline, le GABA, l'histamine, la dopamine et la noradrénaline. ce résultat indique que le peptide est différent des composés endogènes suspectés antérieurement d'interagir avec le transport des amines.

La liaison de la [<sup>3</sup>H]5-HT ou de [<sup>125</sup>I]cyanopindolol sur les récepteurs de type 5-HT<sub>1B/1D</sub> est également inhibée par les peptides suivants avec les CI<sub>50</sub> correspondantes :

- Ala - Leu CI<sub>50</sub> = 10<sup>-6</sup> M
- Leu- Ser CI<sub>50</sub> = 10<sup>-5</sup> M
- 35 - Ala - Leu - Ser CI<sub>50</sub> = 10<sup>-6</sup> M



1. A titre comparatif, le peptide Ala - Leu - Leu - Ser s'est montré inactif dans le seul essai réalisé.

5 Le peptide Ala - Leu est actif dans sa forme L (forme naturelle) et ne présente quasiment pas d'activité dans sa forme D.

10 Les fractions Ala - Leu et Leu - Ser ont également montré une grande spécificité d'interaction, puisque leur effet inhibiteur de liaison ne s'exerçait que sur les sous-types 5-HT<sub>1</sub> des récepteurs 5-HT et plus particulièrement sur le sous-type 5-HT<sub>1B/1D</sub> ; dans les conditions expérimentales utilisées, elles n'apparaissaient pas affecter les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> et 5-HT<sub>3</sub>, ni les récepteurs  $\alpha$  adrénergiques,  $\beta$  adrénergiques, dopaminergiques, muscariniques, histaminergiques, récepteurs aux benzodiazépines et récepteurs aux opiacés. Ces peptides sont également dépourvus d'activité de déplacement du marqueur des sites de transport (<sup>3</sup>H paroxetine) et ne sont pas inhibiteurs de recapture de la 5-HT.

20 L'activité du peptide Ala - Leu a en outre été mesurée dans des essais préliminaires sur la fonction inhibitrice des récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> sur la libération évoquée d'acétylcholine.

25 En accord avec les résultats des études de liaison indiquant une interaction avec les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>, il a été montré que le peptide LSAL antagonisait l'activité modulatrice des récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> à très faible concentration et potentialisait au contraire l'effet d'un agoniste 5-HT<sub>1B</sub> à concentration plus élevée. 30 L'ensemble de ces résultats suggère que ce peptide pourrait jouer le rôle d'un modulateur allostérique du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub>.

3) Interaction de LSAL avec l'activité fonctionnelle des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> (système de transduction)

Les récepteurs 5-HT<sub>1B/D</sub> sont connus pour être majoritairement couplés à la protéine Gi, en inhibant l'activité de l'adénylyl cyclase. L'interaction de LSAL a été examinée sur l'activité enzymatique corrélée à la stimulation du récepteur 5-HT<sub>1B</sub> exprimée dans des cellules NIH 3T3.

Le peptide n'avait pas d'effet sur la production basale d'AMPC. Toutefois, il augmentait significativement l'effet inhibiteur de la 5-HT sur l'activité adénylyl cyclase stimulée par la forskoline (Figure 2). Cet effet était dépendant de la concentration avec une courbe dose-réponse en forme de cloche. L'activité du peptide sur les homogénéisats de substance noire de rat était pratiquement similaire. Ces résultats indiquent clairement que LSAL interagit avec l'activité du récepteur 5-HT<sub>1B</sub>.

20

4) Effets du peptide sur l'activité fonctionnelle cellulaire des récepteurs 5-HT<sub>1B/D</sub>

L'activité du peptide sur la libération de [<sup>3</sup>H]5-HT à partir de synaptosomes d'hippocampe, de cerveau de rat préalablement chargées en amine radioactive a été examinée.

La libération de [<sup>3</sup>H]5-HT induite par K<sup>+</sup> a diminué en présence de LSAL de manière dose-dépendante avec une CI<sub>50</sub> apparente proche de 10<sup>-11</sup>M. L'effet maximum, observé à une concentration de 10<sup>-10</sup>M, correspond à une inhibition de 20 à 25% de la libération évoquée et diminue à des concentrations plus élevées (Figure 3).

Dans des séries d'essais dont les conditions sont proches de celles utilisées pour les essais de liaison (à l'équilibre), le peptide LSAL ne potentialise

35

plus l'action de la 5-HT mais au contraire s'oppose à son effet inhibiteur sur la libération de  $^3\text{H}$ -5HT.

Ces résultats démontrent que LSAL interagit avec la fonction cellulaire corrélée à l'activité des récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer ces résultats est que le peptide LSAL agissant en tant que modulateur allostérique du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> est capable d'induire des transitions conformationnelles de ce récepteur correspondant soit à un état actif (potentialisation) soit à un état désensibilisé (inhibition) du récepteur.

#### 5) Effets in vivo de LSAL

Des essais ont été réalisés in vivo chez la souris, pour examiner les effets comportementaux de LSAL.

Dans la mesure où des études neuro-pharmacologiques antérieures avaient montré l'implication des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> dans les désordres liés au stress et à l'anxiété, les effets du peptide ont été examinés dans deux modèles animaux d'anxiété.

#### Test du champ ouvert

L'activité de LSAL a été déterminée dans le test du champ ouvert sur des souris C57/Black-6. Des souris mâles C57/BL/6 (20-25 g) ont été utilisées. Le champ ouvert consistait en une boîte de plastique blanc (35 x 35 x 20 cm) divisée en 25 carrés égaux. Du LSAL dissous dans 5  $\mu\text{l}$  de 0,9% de solution saline dans un volume de 5  $\mu\text{l}$  a été injecté par voie icv aux souris, qui ont été placées à un angle de la boîte. Après deux minutes, le nombre de carrés traversés, les demi-tours effectués et le temps d'immobilisation ont été mesurés. Les résultats sont exprimés comme la moyenne plus ou moins l'écart type. Différence avec le témoin : \*p < 0,05, \*\*p < 0,005 (Test de Student). A des doses de

50 µg ICV par animal, l'activité exploratrice a été significativement diminuée par rapport à des animaux témoins qui recevaient l'excipient dans les mêmes conditions (tableau 3).

5

**TABLEAU 3**

**Effet d'injections intracérébroventriculaires  
de LSAL chez la souris dans le test  
du champ ouvert**

10

Substance injectée	Nombre d'animaux	Nombre de carrés traversés	Nombre de redressements	Temps d'immobilisation (sec.)
Contrôle (NaCl)	12	115 ± 9	23 ± 3	12 ± 5
LSAL 50 µg	12	88 ± 9 *	15 ± 3 *	47 ± 8 **

15

20

**Labyrinthe en croix surélevé**

25

Ce test expérimental est utilisé pour déterminer le degré d'anxiété et consiste en un labyrinthe surélevé à deux bras, l'un protégé par des parois et l'autre non protégé.

L'animal est supposé anxieux lorsqu'il évite l'entrée et réduit le temps passé dans les bras ouverts.

30

Des souris mâles BALB/C pesant de 20 à 24 g ont été utilisées.

Le labyrinthe en croix surélevé était fait de plexiglas avec bras ouverts et deux bras fermés de la même taille (12,5 x 5 cm) avec des murs de 15 cm de

35

hauteur, ces bras partant d'une plateforme centrale de 5 x 5 cm, placée 40 cm au-dessus du sol.

Du LSAL dissous dans 5 ml de solution saline à 0,9% dans un volume de 5 µl a été injecté icv aux souris. Trois heures plus tard, l'animal a été placé sur la plateforme centrale du labyrinthe. Chaque entrée dans un bras ainsi que le temps passé dans chaque bras a été enregistré. La durée du test était de 5 minutes. Le labyrinthe a été nettoyé après chaque essai.

Le LSAL a été testé dans des conditions de basse intensité lumineuse (BENJAMIN D. et al., Life Sci. 47, 195-203 (1990)).

Les résultats ont été exprimés comme la moyenne plus ou moins l'écart type du pourcentage des entrées dans les bras ouverts (% d'entrées dans les bras ouverts), pourcentage du temps passé dans les bras ouverts (% temps dans le bras ouvert) et nombre total d'entrées dans les bras. Différence avec le témoin : \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 (Test de Student).

**TABLEAU 4A**

(1 heure après injection i.v.)

Substance injectée	Nombre d'animaux	% entrées dans les bras ouverts	% temps passé dans les bras ouverts	Entrées totales dans les bras
Témoin (NaCl)	16	77 ±9	74±8	5±1
LSAL 0,5 µg	16	63±11	64±8	8±2
LSAL 2 µg	16	69±10	73±8	8±2
LSAL 10 µg	16	80±6	69±6	9±2*

**TABLEAU 4B**  
(3 heures après injection i.v.)

5	Substance injectée	Nombre d'animaux	% entrées dans les bras ouverts	% temps passé dans les bras ouverts	Entrées totales dans les bras
	Témoin (NaCl)	35	62±5	71±5	8±1
	LSAL 2 µg	6	60±8	62±9	15±2**
	LSAL 10 µg	16	80±5**	85±4*	14±1**
10	LSAL 50 µg	26	56±7	55±7*	8±1

15 Ce résultat suggère fortement que dans les conditions expérimentales mises en oeuvre, le peptide a un effet anxiogène. Une dose de 10 µg de LSAL augmente le nombre d'entrées dans les bras ouverts non protégés du labyrinthe, suggérant un effet anxiolytique de ce peptide dans les conditions d'essai.

#### Test de la nage forcée

20 Le test de la nage forcée (Porsolt) est un test simple qui ne peut en aucun cas être assimilé à un modèle de "dépression". Il a cependant le mérite de discriminer un bon nombre de substances antidépresseurs. Il faut cependant remarquer que quelques antidépresseurs ne sont pas actifs dans ce test et certaines substances non antidépresseurs y sont actives.

25 Dans des conditions expérimentales où l'on mesure l'activité d'antidépresseurs dans ce test, il a été montré que le peptide Ala - Leu injecté par voie ip à forte concentration, mais aussi i.c.v. (intra cérébro-ventriculaire) à faible concentration, réduit légèrement mais significativement le temps d'immobilité des souris ;

30

les antidépresseurs de type noradrénergique (nomifensine) sont beaucoup plus efficaces que le peptide dans ce test, mais les antidépresseurs sérotoninergiques ont également une activité faible.

5                   La mesure de l'activité locomotrice horizontale a été réalisée dans un appareil d'activométrie. Le peptide a un effet stimulant. Au cours de ce test, une forte augmentation des défécations (signe lié à l'anxiété) a été notée chez des animaux qui ont reçu le peptide.

10                  Cependant, dans tous ces essais, il semble que l'état de "stress" initial des animaux joue un rôle dans l'amplitude des phénomènes observés.

                  Diverses séries d'essais ont été réalisées sur les effets du dipeptide Ala - Leu sur l'appétit. Des  
15   administrations i.c.v. de 7 à 30 µg du peptide ont des effets très significatifs sur la prise de nourriture chez la souris, puisqu'elles entraînent sur 24 heures une diminution de près de la moitié de la consommation alimentaire des animaux, ainsi qu'une perte de poids  
20 également significative.

                  Ces dernières observations sont bien en accord avec le fait que les antidépresseurs sérotoninergiques ont le plus souvent des effets importants sur la prise alimentaire, certains favorisant, d'autres réduisant le poids chez les patients traités, et que leur  
25   activité est mise à profit dans les cas de boulimie ou d'anorexie qui souvent accompagnent la dépression.

                  Ces modifications comportementales observées après administration in vivo de LSAL et d'autres peptides  
30   selon l'invention montrent fortement que les modifications moléculaires et cellulaires induites par le peptide conduisent effectivement à des modifications de la fonction du système nerveux central. En fait, LSAL semble capable d'induire de l'anxiété après administration in  
35   vivo. LSAL apparaît comme un régulateur endogène, capable

de moduler finement le contrôle exercé par la 5-HT sur la neurotransmission au niveau du système nerveux central. Il joue vraisemblablement un rôle-clé dans les fonctions physiologiques (sommeil, thermo-régulation, apprentissage et mémoire, comportement, douleur, ...), ainsi que dans des mécanismes physio-pathologiques (stress, anxiété, dépression, agressivité, désordres alimentaires, etc...) connus ou fortement soupçonnés pour impliquer le système sérotoninergique. Il devrait également jouer un rôle important dans les pathologies liées à la tension artérielle et la migraine, car des récepteurs de type 5-HT<sub>1</sub> (5-HT<sub>1</sub>-like (probablement des 5-HT<sub>1D</sub>)) ont été localisés dans les vaisseaux de cerveau humain et dans d'autres muscles lisses.

Il régule sans doute également la réponse immune dans la mesure où les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> sont présents dans des tissus immuno-compétents, et dans la mesure où la transmission de la 5-HT est connue pour interagir avec la réponse immunitaire.

20

#### 7) Activité relative des peptides selon l'invention

L'activité relative de différents aminoacides ou peptides à 1 nM a été déterminée sur des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> et 5-HT<sub>1B/1D</sub> à l'aide de 0,3 nM de [<sup>125</sup>I] cyanopindolol et 30 nM [<sup>3</sup>H] 5-HT respectivement. Les expériences de liaison ont été réalisées comme décrit précédemment. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'effet de LSAL. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  l'écart type de trois essais indépendants réalisés en cinq exemplaires.

35



TABLEAU 5

	AMINOACIDES ET PEPTIDES	PUISSANCE RELATIVE	
		Récepteurs 5-HT <sub>1B/D</sub> ([ <sup>3</sup> H]5-HT)	Récepteurs 5-HT <sub>1B</sub> ([ <sup>125</sup> I]cya- nopindolol)
5	ALA	0 ± 4	1,7 ± 1,68
	LEU	2 ± 9	0 ± 2
	SER	0 ± 5	0 ± 1,7
	ALA-LEU	50 ± 5	61,5 ± 5
	β-ALA-LEU	0 ± 13	N.D. *
10	D-ALA-LEU	0 ± 10	N.D. *
	β-ALA-DL-LEU	2 ± 13	N.D. *
	LEU-ALA	1 ± 2	1,7 ± 1,6
	LEU-SER	45,7 ± 7	53,8 ± 8
	SER-LEU	4 ± 4	N.D.*
15	ALA-LEU-SER	28 ± 10	33,8 ± 10
	ALA-LEU-LEU-SER	10 ± 15	23,6 ± 10,6
	LEU-SER-ALA-LEU	100 ± 5	100 ± 10
	AC-LEU-SER-ALA-LEU	26,7 ± 10	N.D.*
	LEU-SER-ALA-LEU-NH <sub>2</sub>	83,3 ± 16	N.D.*
20	LEU-SER-ALA-LEU-GLY-		
	GLY-GLY-TYR	80,9 ± 9,5	N.D.*

\* N.D. : non déterminé

REVENDICATIONS

## 1. Composé de séquence peptidique

X Leu Y

5

dans laquelle X représente H ou Ala ou Leu-Ser-Ala, Y représente OH ou une séquence peptidique ayant de 1 à 10 aminoacides, dont l'extrémité carboxy terminale est amidifiée par un groupe NH<sub>2</sub> ou estérifiée par un reste hydrocarbyloxy substitué ou non substitué,

10

sous réserve que X et Y ne représentent pas simultanément H et OH, respectivement

15

ainsi que les composés correspondants dans lesquels le groupe de liaison peptidique -CO-NH- est remplacé par un groupe de liaison résistant à la dégradation enzymatique des protéases, ou dans lesquels le squelette peptidique comporte un ou plusieurs groupes intercalés rendant la liaison peptidique résistante à la dégradation enzymatique.

20

## 2. Composés de séquence peptidique suivante :

Leu - Ser - Ala - Leu - Z

25

dans laquelle Z représente OH, NH<sub>2</sub>, un reste hydrocarbyloxy substitué ou non substitué, ou une séquence peptidique ayant de 1 à 10 aminoacides, ainsi que les composés correspondants dans lesquels la liaison peptidique est remplacée par une liaison résistante à la dégradation enzymatique des protéases ou dans lesquels le squelette peptidique comporte un ou plusieurs groupes intercalés rendant la liaison peptidique résistante à la dégradation enzymatique.

30

## 3. Composés selon la revendication 1 ou 2,

dans lesquels le groupe de liaison peptidique -CO-NH- est remplacé par un groupe choisi parmi -CO- NR', -CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>-

35

CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>-, -CO-CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>-, ou dans lesquels le squelette peptidique présente un ou plusieurs groupes intercalés choisis parmi les groupes -CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>-, -O-, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub>, identiques ou différents, représentant H ou un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> et R' représentant un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

4. Composés selon la revendication 1 ou 2, comprenant une séquence choisie parmi :

10                   Ala - Leu  
                     Leu - Ser  
                     Ala - Leu - Ser  
                     Leu - Ser - Ala - Leu  
                     Leu - Ser - Ala - Leu - OCH<sub>3</sub>  
 15                   Leu - Ser - Ala - Leu - NH<sub>2</sub>  
                     Leu - Ser - Ala - Leu - Gly - Gly - Gly - Tyr

ainsi que les composés correspondants dans lesquels la liaison peptidique est remplacée par une liaison résistante à la dégradation enzymatique des protéases, ou dans lesquels le squelette peptidique comporte un ou plusieurs groupes intercalés rendant la liaison peptidique résistante à la dégradation enzymatique.

5. Composés selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils sont sous la forme L.

6. Composé apte à remplir le rôle de ligand du récepteur sur lequel se fixe le peptide endogène de séquence Leu-Ser-Ala-Leu (LSAL), caractérisé en ce qu'il comprend un groupement dont la structure spatiale est sensiblement identique à celle d'un peptide de séquence

X - Leu - Y

dans laquelle X et Y sont tels que définis à la revendication 1,

X et Y ne représentant pas simultanément H et OH, respectivement.

7. Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'ils comprennent un groupement dont la structure spatiale est sensiblement identique aux peptides suivants :

Ala-Leu,  
Leu-Ser,  
Ala-Leu-Ser, et  
Leu-Ser-Ala-Leu.

8. Composé suivant la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé en ce qu'ils comprennent un groupement dans lequel la position moyenne des atomes formant le groupement qui se lie au récepteur ne diffère qu'au plus de 5 % de la position moyenne des atomes formant le peptide correspondant.

9. Composé selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé en ce qu'ils comprennent un groupement dans lequel la position moyenne des atomes formant le groupement qui se lie au récepteur ne diffère qu'au plus de 2 % de la position moyenne des atomes formant le peptide correspondant.

10. Procédé de production d'un composé selon l'une des revendications 6 à 9, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une modélisation informatique à partir de(s) la (les) structure(s) spatiale(s) des peptides correspondants et synthèse chimique classique à partir de la structure obtenue après modélisation.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la modélisation est réalisée à partir de la structure spatiale de molécules d'antidépresseurs actives sur le site de fixation du peptide endogène.

12. Composition thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé selon l'une

quelconque des revendications 1 à 11.

13. Composition thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend une molécule précurseur susceptible de libérer in vivo un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

14. Procédé de diagnostic in vitro d'une affection liée au système sérotoninergique chez un patient, caractérisé en ce que l'on effectue un dosage dans un fluide biologique du patient d'un peptide de séquence

Leu - Ser - Ala - Leu

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le dosage est effectué à l'aide d'un anticorps spécifique dudit peptide.

16. Anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé spécifiquement contre un peptide tel que défini dans la revendication 14, ainsi que les fragments dudit anticorps, notamment les fragments Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> ou Fc.

17. Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 14 ou la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps ou un fragment d'anticorps tels que définis à la revendication 16.

18. Procédé de criblage de substances antidépressives occupant le même site conformationnel que le peptide Leu-Ser-Ala-Leu, caractérisé en ce que l'on réalise une discrimination par des essais d'inhibition entre d'une part leur liaison sur le site de recapture de la 5-HT et d'autre part entre leur liaison sur le site 5-HT<sub>1B/1D</sub>.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'on compare la constante d'inhibition K<sub>i</sub> des substances à tester par des essais d'inhibition de liaison en présence d'un peptide selon la

revendication 1 ou la revendication 2 à la constante d'inhibition  $K_i$ , de ces mêmes substances, pour inhiber la recapture de la 5-HT ou déplacer un inhibiteur de recapture.

5                   20. Composition diagnostique comprenant un composé selon la revendication 1 ou la revendication 2, radiomarké.

10                   21. Procédé de visualisation des sites peptidiques des récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub>, caractérisé en ce que l'on utilise une composition selon la revendication 20 et que l'on visualise les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> à l'aide d'un scanner de tomographie par émission de positions.

15                   22. Procédé de mise en évidence de ligands du site du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> pour le peptide LSAL, caractérisé en ce que l'on effectue les étapes consistant à :

20                   - mettre en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non identifiées avec une cellule recombinée exprimant à sa surface le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> en présence d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans des conditions permettant l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> et ladite (lesdites) molécule(s), dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub>;

25                   - détecter la quantité dudit composé selon l'invention liée au récepteur;

                  - en déduire la fixation éventuelle de ladite (desdites) molécule(s).

30                   23. Procédé selon la revendication 22 pour la mise en évidence d'agonistes ou d'antagonistes du peptide endogène LSAL.

35                   24. Procédé de mise en évidence de modulateurs du site du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> pour le peptide LSAL caractérisé en ce que l'on effectue les étapes consistant à :

- mettre en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non identifiées avec une cellule recombinée exprimant à sa surface le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> en présence d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans des conditions permettant l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> et ledit composé selon l'une des revendications 1 à 11;

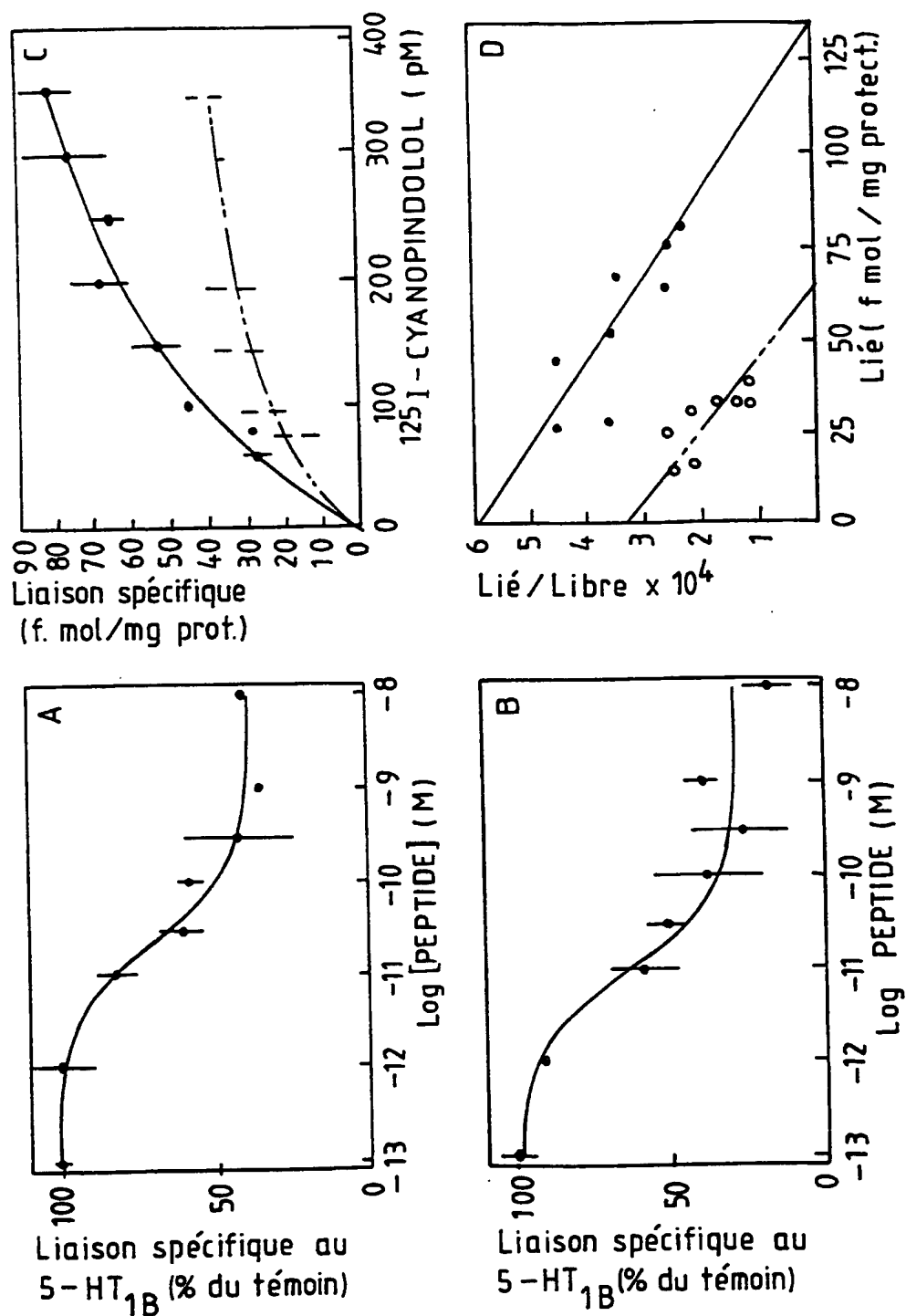
- détecter les molécules capables de moduler l'activité du composé selon l'une des revendications 1 à 11 sur ledit récepteur.

25. Ligand ou modulateur du site du récepteur 5-HT<sub>1B/1D</sub> pour le peptide LSAL, identifié selon le procédé de la revendication 22 ou 24.

26. Composition thérapeutique comprenant comme principe actif un ligand ou modulateur selon la revendication 25.

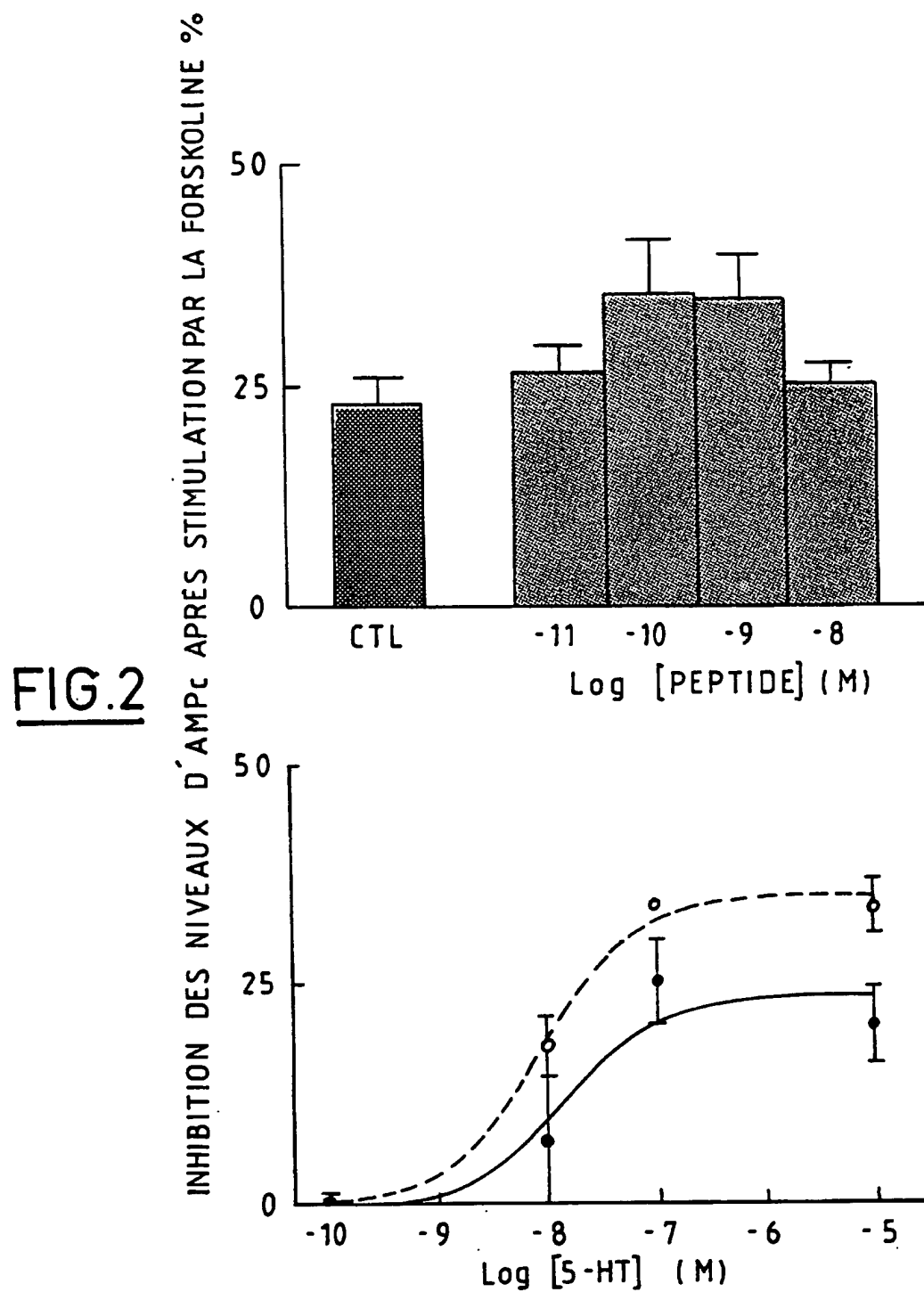
27. Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 11 pour la préparation d'une composition ayant une activité modulatrice de la liaison sérotoninergique.

FIG.1

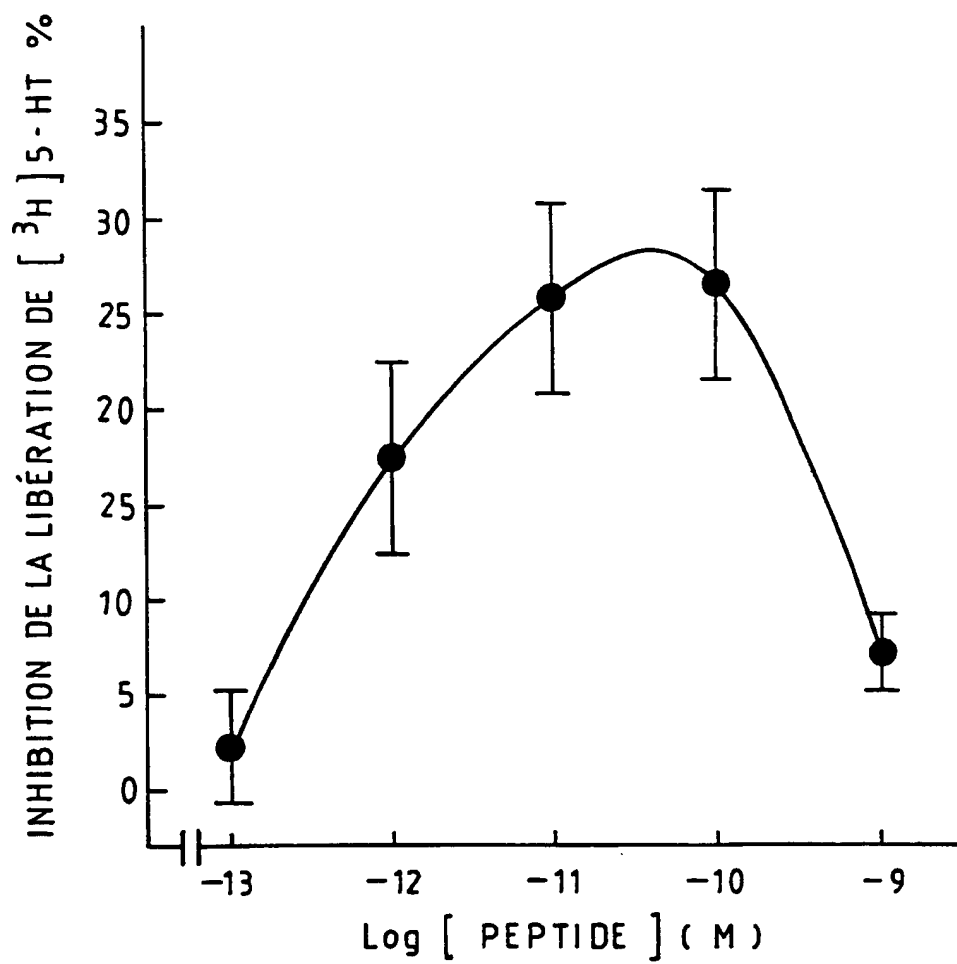




2/3



3/3

FIG.3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nat. Application No

PCT/FR 94/01158

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 6	C07K5/062	C07K5/083	C07K5/103	C07K7/06	C07K16/18
	A61K38/05	A61K38/06	A61K38/07	A61K38/08	G01N33/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
IPC 6 C07K A61K G01N					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage				Relevant to claim No.
X	WO,A,91 11463 (INSTITUT PASTEUR) 8 August 1991 cited in the application see claims; examples ---				1-24,27
X	PHARMACOLOGICAL REVIEWS, vol.44, no.3, September 1992 pages 401 - 458 E. ZIFA AND G. FILLION '5-Hydroxytryptamin Receptors' see page 417 - page 424 --- -/--				1,2,12, 16,25,26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents :					
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
11 January 1995			25. 01. 95		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer  Fuhr, C		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/FR 94/01158

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol.276, no.2, 1 February 1990, SAN DIEGO, US pages 305 - 309 G.D. JOHNSON AND L.B. HERSH 'Studies on the Subsite Specificity of the Rat Brain Puromycin-Sensitive Aminopeptidase' see tables 1,2 ---	1,4-11, 25,26
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9210, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-076744 & JP,A,4 021 635 (SUNTORY LTD) see abstract ---	1,4-9,12
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 7534, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 75-56264W & JP,A,50 013 373 (DAIGO NUTRITIVE CHEM KK) see abstract ---	1,6
X	EP,A,0 017 485 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 15 October 1980 see claims; tables II,IV,XIII ---	1,4-9
A	EP,A,0 366 638 (KABIGENAB) 2 May 1990 see claims; examples -----	1,4-6, 12,25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR94/01158

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
See annexe
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR94/01158

Claims completely searched: 1-5, 14-24.

Claims incompletely searched: 6-11, 25, 26 and 12, 13, 27 in part.

Remark: In view of the imprecise nature of the ligands claimed in claims 6-11, 25, 26 and 12, 13, 27 in part, the search on these ligands and use thereof has been limited to the examples given in the description.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Application No

PCT/FR 94/01158

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9111463	08-08-91	FR-A- 2657784	09-08-91
EP-A-0017485	15-10-80	AT-T- 9595	15-10-84
		AU-B- 545416	11-07-85
		AU-A- 5981580	22-10-80
		CA-A- 1160973	24-01-84
		CA-A- 1177429	06-11-84
		WO-A- 8002157	16-10-80
		SU-A- 1378785	28-02-88
		US-A- 4339534	13-07-82
		US-A- 4806473	21-02-89
EP-A-0366638	02-05-90	CA-A- 2001498	27-04-90
		JP-A- 2250895	08-10-90
		SE-A- 8803847	27-10-88

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6	C07K5/062	C07K5/083	C07K5/103	C07K7/06	C07K16/18
	A61K38/05	A61K38/06	A61K38/07	A61K38/08	G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,91 11463 (INSTITUT PASTEUR) 8 Août 1991 cité dans la demande voir revendications; exemples ---	1-24,27
X	PHARMACOLOGICAL REVIEWS, vol.44, no.3, Septembre 1992 pages 401 - 458 E. ZIFA AND G. FILLION '5-Hydroxytryptamin Receptors' voir page 417 - page 424 --- -/--	1,2,12, 16,25,26

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "B" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Janvier 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25.01.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C



## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol.276, no.2, 1 Février 1990, SAN DIEGO, US pages 305 - 309 G.D. JOHNSON AND L.B. HERSH 'Studies on the Subsite Specificity of the Rat Brain Puromycin-Sensitive Aminopeptidase' voir tableaux 1,2 ---	1,4-11, 25,26
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9210, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-076744 & JP,A,4 021 635 (SUNTORY LTD) voir abrégé ---	1,4-9,12
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 7534, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 75-56264W & JP,A,50 013 373 (DAIGO NUTRITIVE CHEM KK) voir abrégé ---	1,6
X	EP,A,0 017 485 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 15 Octobre 1980 voir revendications; tableaux II,IV,XIII ---	1,4-9
A	EP,A,0 366 638 (KABIGENAB) 2 Mai 1990 voir revendications; exemples -----	1,4-6, 12,25

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

emande internationale n°

PCT/FR94/01158

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
  
Voir annexe
2. ☐ Les revendications n°  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR PCT/ISA/210

Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes : 1-5, 14-24.  
Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes : 6-11, 25, 26  
et 12, 13, 27 partiellement.

Remarque: Vu le caractère indéfini des ligands revendiqués dans les  
revendications 6-11, 25, 26 et 12, 13, 27 partiellement, la recherche de ces  
ligands ainsi que leur utilisation a été limitée aux exemples figurant dans  
la description.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 94/01158

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO-A-9111463	08-08-91	FR-A- 2657784	09-08-91
EP-A-0017485	15-10-80	AT-T- 9595	15-10-84
		AU-B- 545416	11-07-85
		AU-A- 5981580	22-10-80
		CA-A- 1160973	24-01-84
		CA-A- 1177429	06-11-84
		WO-A- 8002157	16-10-80
		SU-A- 1378785	28-02-88
		US-A- 4339534	13-07-82
		US-A- 4806473	21-02-89
EP-A-0366638	02-05-90	CA-A- 2001498	27-04-90
		JP-A- 2250895	08-10-90
		SE-A- 8803847	27-10-88